

English Abstract for Reference A0

**Abstract (Basic): DE 19740735 A**

NOVELTY - Polyclonal and monoclonal antibodies specific for the *Borrelia burgdorferi* 24 kD antigen OspC are new.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) an antigen that immunoreacts with an antibody as above; (2) recombinant DNA encoding the antigen; and (3) a recombinant vector containing at least one copy of the DNA.

USE - The antibodies are useful for treatment or prevention of Lyme disease, preferably by intraperitoneal injection in unit doses of 0.1 μg to 1 mg, optionally together with antibodies specific for the *Borrelia burgdorferi* 31 kD antigen OspA. The antibodies can also be used to isolate the OspC antigen by screening *B. burgdorferi* DNA libraries with the antibodies and isolating positive clones. The antibodies are also capable of curing or inhibiting the progression of arthritis and carditis in immunodeficient experimental animals (especially Scid mice) infected with viable pathogenic *B. burgdorferi* (especially the ZS7 strain), or are capable of inactivating the spirochaetes in such animals.

This Page Blank (uspto)

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/63, 15/31, A61K 39/40, C07K 16/12, 14/195</b>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/14345</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>25. März 1999 (25.03.99)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/05852</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>15. September 1998 (15.09.98)</b>		
(30) Prioritätsdaten: <b>197 40 735.8 16. September 1997 (16.09.97) DE</b>		
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).</b>		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>SIMON, Markus, M. [DE/DE]; Sebastian-Kneipp-Strasse, D-79104 Freiburg (DE). ZHONG, Weimin [CN/DE]; Sundgau Allee 12, D-79106 Freiburg (DE). WALLICH, Reinhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52, D-69118 Heidelberg (DE). KRAMER, Michael, D. [DE/DE]; Bergstrasse 85, D-64319 Pfungstadt (DE).</b>		<i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(74) Anwälte: <b>WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</b>		

(54) Title: MEDICAMENT FOR TREATING A MANIFESTED LYME DISEASE

(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ZUR THERAPIE EINER MANIFESTEN LYME-BORRELIOSIS

(57) Abstract

The invention relates to a pharmaceutical composition for treating lyme disease comprising an antibody as an active agent. Said antibody is specifically for the 24kDa-antigen (OspC) from *B. burgdorferi*, preferably an antibody which is specifically for the 24kDa-antigen (OspC) from *B. burgdorferi* represented by the sequence corresponding to SEQ ID NO. 2.

(57) Zusammenfassung

Eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit umfasst als Wirkstoff einen Antikörper, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist, vorzugsweise einen Antikörper, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz ist.

AO

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 1 -

### Arzneimittel zur Therapie einer manifesten Lyme-Borreliose

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit und einen Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit sowie ein Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffes zur Behandlung der Lyme-Krankheit und ein Verfahren zur Gewinnung eines Impfstoffs gegen die Lyme-Krankheit.

Die Lyme-Borreliose ist eine von Zecken übertragene Infektionskrankheit, die durch Spirochete *Borrelia burgdorferi* hervorgerufen wird. Die Krankheit ist eine chronische progressive Infektion, die viele Organe, wie etwa die Haut, das zentrale und periphere Nervensystem, das Herz, die Leber, die Niere, das muskuloskelettale System und Gelenke befällt. Verschiedene Symptome, wie etwa akute Arthritis und Neuroborreliose, können spontan verschwinden, treten jedoch zumeist episodisch wieder auf. Spirocheten wurden wiederholt aus unbehandelten Patienten isoliert, und es gibt zahlreiche Anzeichen für persistente Infektionen selbst nach einer Therapie mit Antibiotika. Da eine zuverlässige Behandlung dieser Krankheit durch Therapie mit Antibiotika deshalb schwierig ist, werden große Anstrengungen unternommen, den Erreger selbst und die Immunantwort des Wirts auf Infektion mit *B. burgdorferi* zu erforschen. Bei den von der Lyme-Krankheit betroffenen Personen wird zwar zumeist ein hoher Titer an Antikörpern gegen *B. burgdorferi* im Verlauf der Infektion festgestellt, der aber keinen Schutz gegen die Infektion bewirkt.

Es wurde festgestellt, dass das äußere Oberflächenlipoprotein A (OspA) von *B. burgdorferi* ein wirksamer Impfstoff für die Prophylaxe der Lyme-Erkrankung sein könnte (EP 0 418 827). Laboruntersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass ein weitgehender Schutz gegen eine Erkrankung in Infektion durch OspA-spezifische Antikörper erhalten werden kann (Schaible et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772).

- 2 -

Diese Antikörper sind jedoch nur wirksam, wenn sie zur Zeit der Übertragung des Erregers vorliegen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass OspA hauptsächlich auf Spirocheten in Zecken exprimiert wird, nach ihrer Transmission auf einen Säugerwirt jedoch nicht mehr exprimiert wird.

5 Folglich können OspA-spezifische Antikörper zwar verwendet werden, um die Übertragung der Krankheit zu verhindern, sind aber wirkungslos und somit ungeeignet für therapeutische Anwendungen zur Behandlung der ausgebrochenen Krankheit. Kürzliche Untersuchungen zeigen, dass nach aktiver Immunisierung mit rekombinantem OspC Mäuse gegen eine 10 Zecken-übertragene Infektion geschützt werden konnten (Preac-Mursic et al., Infection 20 (1992), 342-349; R.D. Gilmore et al., Infect. Immun. 64 (1996), 2234-2239). Das dort verwendete Immunisierungsprotokoll führt jedoch nicht zur Eliminierung von infektiösen Spirocheten vom Vektor, wie durch OspA-spezifische Antikörper gezeigt wurde.

15

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Arzneimittel zur Behandlung der Lyme-Krankheit bereitzustellen.

20 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24 kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass eine spontane Auflösung der Erkrankung und/oder Eliminierung von Spirocheten in verschiedenen 25 Mausarten unter Verwendung von hohen Titern an OspC-spezifischen Antikörpern erzielt wurde. Bevorzugt umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit als Wirkstoff einen Antikörper, der spezifisch für das 24 kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz ist.

30

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass der passive Transfer von polyklonalem OspC-reaktivem Immunserum in *B. burgdorferi*-infizierte

- 3 -

scid-Mäuse zu einer vollständigen Auflösung von chronischer Arthritis und Carditis wie zur Eliminierung des Pathogens führt. Für eine wirksame Bekämpfung einer Infektion scheint ein kritischer Grenzwert von OspC-spezifischen Antikörpern wichtig zu sein, der zwischen 3 und 10 µg Anti-OspC-Antikörper liegt. Dies bedeutet, dass Spirocheten OspC im Säugervirt exprimieren und für Schutzantikörper im betroffenen Gewebe während der Infektion empfindlich sind. Deshalb ist ein Angreifen von OspC für eine erfolgreiche therapeutische Behandlung der Lyme-Erkrankung relevant.

10

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Immunseren aus B. burgdorferi-infizierten Mäusen einen vollständigen Schutz gegen eine Erkrankung und Infektion nur dann gewährleisteten, wenn sie vor, nicht aber wenn sie nach einer Inokulation mit dem Pathogen verabreicht wurden. In der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, dass die spontane Auflösung der Infektion mit Antikörpern gegen OspC möglich ist, wobei die Spirocheten im Wirbeltier inaktiviert werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass es möglich ist, mit polyklonalen OspC-spezifischen Immunseren sowohl Arthritis als auch Carditis aufzulösen und bestehende Spirochetinfektionen in C.B.-17 scid-Mäusen zu heilen, unabhängig davon, ob die Antikörper vor dem Auftreten (z.B. 10 Tage vor der Infektion) oder alternativ zu einem Zeitpunkt, an dem die Krankheit voll ausgebrochen (am 19. Tag nach Infektion) war oder es sich um eine chronische Erkrankung handelte (Tag 60 nach Infektion). Die vollständige Auflösung der Erkrankung und Eliminierung des Pathogens war Dosisabhängig und wurde mit 1 µg bis 10 mg Anti-OspC- Antikörper/Maus, bevorzugt 5 µg bis 20 µg Anti OspC-Antikörper/Maus erzielt.

Entzündliche Läsionen an Gelenken oder im Herzen von B. burgdorferi-inokulierten scid-Mäusen wurden durch polyklonale Immunseren gegen OspC vollständig aufgelöst, selbst wenn sie zu einem Zeitpunkt verab-

- 4 -

reicht wurden, zu dem eine chronische Erkrankung vorlag, d.h. am 60.

Tag p.i.

Nachstehend wird die Erfindung anhand der Figuren der Zeichnung und  
5 der Beispiele erläutert.

Figurenbeschreibung:

Figur 1 zeigt eine Western Blot-Analyse von NMS und IS, welche für  
10 passive Immunisierung von C.B.-17 scid-Mäusen verwendet wurden.  
Spur 1 zeigt einen Standard von Maus mAbs gegen Hsp70 (70 kDa),  
Hsp60 (60 kDa), Flagellin (41 kDa), OspB (34 kDa), OspA (31 kDa),  
OspC (24 kDa), pLA7 (20 kDa) und p7,5 (7,5 kDa). Spur 2: NMS,  
gesammelt von naiven BALB/c-Mäusen. Spur 3: Polyklonales Immunse-  
15 rum, gebildet in BALB/c-Mäusen, immunisiert mit rLip-OspA in ABM2-  
Adjuvans. Spur 4: Polyclonales IS, gebildet in BALB/c-Mäusen, immuni-  
siert mit rOspC in ABM2-Adjuvans, wie hierin beschrieben.

**Figur 2**

20 Kinetik des Auftretens von *B. burgdorferi*-spezifischen (IgG) oder OspC-  
spezifischen (IgM/IgG) Antikörpern (A) und Korrelationsanalyse von  
Serumgehalten von entweder Gesamt-*B. burgdorferi*-spezifischen oder  
OspC-spezifischen Antikörpern (IgG) und Elimination von Spirocheten von  
infizierten Mäusen (B). AKR/N, C57BL/6 und BALB/c-Mäuse (6 bis 8  
25 Wochen alt) wurden durch Spritzeninjektion mit  $10^3$  Spirocheten in den  
Schwanz (s.c.) infiziert. Die Mengen an *B. burgdorferi*-spezifischen (IgG)  
und OspC-spezifischen Antikörpern (IgM und IgG) in Seren von einzelnen  
Mäusen wurden mit ELISA unter Verwendung von Gesamtzell-  
lysaten (*B. burgdorferi*-Stamm ZS7) oder rOspC (ZS7) als Substrate  
30 untersucht. Die Daten stellen das Mittel von einzelnen untersuchten  
Serumproben dar (AKR/N und C57BL/c: 10 Mäuse/Gruppe; BALB/c: 7  
Mäuse; A). Korrelation zwischen Serumgehalten von Gesamt-*B. burgdor-*

- 5 -

feri-spezifischen IgG-Antikörpern, OspC-spezifischen IgG-Antikörpern (Tag 23 p.i.) und die Möglichkeit, Spirocheten aus Ohrgewebe zu rekultivieren (Tag 90 p.i.) wurde durch Korrelationsassay (B) analysiert.

5      **Figur 3** zeigt die DNA-Sequenz und die Proteinsequenz des 24 kDa-Antigens (OspC) von *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 2)

**Figur 4** zeigt die Konstruktion des Plasmids pG OspC-ZS, welches das OspC-Gen enthält.

**Tabelle 1**  
**Unterschiedliche therapeutische Wirkungen von Immunseren gegen OspA und OspC an etablierten B. burgdorferi-Infektionen von C.B.-17 scid-Mäusen**

Zeitab- stände des Serum- trans- fers (Tage p.i.)	Transferiertes Serum (Do- sis)	Maus Nr.	Klinische Arthritis (Tage p.i.)						Ohrgewebe- kultur (Tage p.i.)
			10	19	30	40	50	70	
5									
10									
15									
20									
- 1 h									
	Anti-OspA I.S. (3µg/Maus)	1 2 3 4 5	-/- -/- -/- -/- -/-	±/- -/- -/- -/- -/-	(±)/- -/- -/- -/- -/-	(±)/- -/- -/- -/- -/-	(±)/- -/- -/- -/- -/-	±/- -/- -/- -/- -/-	- - - - -

Anti-OspC I.S. (3 $\mu$ g/Maus)	1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
NMS 100 $\mu$ l/Maus	1	-/-	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+
	2	-/-	(±)/-	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+
	3	(±)/-	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+
	4	(±)/(±)	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+	±/+
	5	-/(±)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Anti-OspA I.S. (10 $\mu$ g/Maus)	1	-/(±)	±/±	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+
	2	-/-	+/-	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+
	3	-/(±)	+/-	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+
	4	(±)/(±)	±/±	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+
	5	-/-	±/++	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+	++/+
Anti-OspC I.S. (10 $\mu$ g/Maus)	1	(±)/±	-/-	(±)/-	(±)/-	(±)/-	(±)/-	(±)/-	(±)/-
	2	-/(±)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	3	-/(±)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

10, 14,  
19, 22

	NMS 100 µl/Maus	1 -/-	-/- -/-	-/- ± / ±	± / ± + + / +	+					
		2 -/-	-/- -/-	-/- -/-	+ + / + + + / +	+					
		3 -/-	-/- -/-	-/- -/-	(±) / -	+ + / + + + / +	+				
		4 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-	+ + / + + + / +	-/-				
		5 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-	+ + / + + + / +	-/-				
19, 22, 26, 30	Anti-OspA I.S. (10µg/Maus)	1 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	+
		2 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	+
		3 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	+
		4 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	+
		5 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	+
	Anti-OspC I.S. (10µg/Maus)	1 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-
		2 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-
		3 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-
		4 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-
		5 -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/-

**Tabelle 2**  
**Therapeutische Wirkung eines Immunserums gegen OspC 60 Tage nach der Infektion von C.B.-17 scid-Mäusen mit  
 $10^3$  B. burgdorferi-ZS7**

5	Anti-OspC-Serum ( $\mu\text{g}/\text{Maus}$ )	Zeitabstände des Serum-transfers (Tage p.i.)	Maus	Klinische Arthritis (Tage p.i.)					Ohrgewebskultur von Spirocheten	
				10	19	60	70	80	100	
10	0,3	10,14, 19,22	1	-/-	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	n.d.
		2	-/-	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	n.d.
		3	-/-	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+
10	10	1	-/-	+ /+	+ +/+	+ +/+	+ /+	-/-	-/-	n.d.
		2	-/-	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ /+	-/-	-/-	+
		3	(±)/-	+ +/+	+ +/+	+ +/+	+ /+	(±)/(±)	-/(±)	+

6 Tabelle 3  
 Histopathologische Untersuchung von betroffenen Organen aus einzelnen infizierten scid-Mäusen nach einer  
 therapeutischen Behandlung mit Immunseren

Zeitab- stände des Serum- transfers (Tage p.i.)	Transferiertes Serum (Do- sis)	Necropsy- Tag p.i.	Klinische Arthritis	Histopathologische Untersuchung		
				Gelenk	Herz	Leber
Keine	Keine	10 27	-/- ++/+	+	+	n.t.* ++
	NMS 100µl/Maus	45	++/+ ++	++	++	n.t. +
	Anti-OspA I.S. (3µg/Maus)	45	-/-	-	-	-
-1 h	Anti-OspC I.S. (3µg/Maus)	45	-/-	-	-	-

10,14, 19,22	NMS 100µl/Maus	45	++/+ +	+++	++	+	±
	Anti-OspA I.S. (10µg/Maus)	45	++/+ +	++	+	-	-
	Anti-OspC I.S. (10µg/Maus)	45	-/-	-	-	-	n.t.*
							-
19,22, 26,30	NMS 100µl/Maus	45	++/+ +	+++	++	+	±
	Anti-OspA I.S. (10µg/Maus)	45	++/+ +	++	++	+	±
	Anti-OspC I.S. (10µg/Maus)	45	±/±	+	-	-	-

\* nicht getestet

**Beispiel 1****Materialien und Methoden****a) Mäuse und Infektion mit *B. burgdorferi*.**

5 Ausgewachsene Mäuse der Stämme AKR/N (H-2<sup>k</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>),  
BALB/c (H-2<sup>d</sup>) und C.B.-17 scid (H-2<sup>d</sup>) wurden unter spezifischen patho-  
genfreien Bedingungen gezüchtet. Zwischen 6 und 8 Wochen alte  
weibliche Tiere wurden für die Experimente verwendet. Die Mäuse  
wurden subkutan (s.c.) mit  $1 \times 10^3$  niedrigpassagierten (zwei bis vier in  
10 vitro Passagen) Organismen *B. burgdorferi* des Stammes ZS7 (Schaible et  
al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772) in den Schwanz  
geimpft.

**b) Rekombinante Antigene.**

15 Ein vollständiges rekombinantes lipidiertes OspA (rLip-OspA) von *B.*  
*burgdorferi*, Stamm ZS7, wurde wie beschrieben (Gern et al., Immunol.  
Lett. 39 (1994), 249-258) hergestellt. Ein Glutathion-S-Transferase OspC  
Fusionsprotein (rOspC) von *B. burgdorferi*, Stamm ZS7, wurde unter  
Verwendung bekannter Techniken (R. Wallich et al., Infect. Immun. 64  
20 (1995), 3327-3353) hergestellt.

**c) Polyklonales Immunserum.**

BALB/c-Mäuse wurden mit entweder 10 µg rLip-OspA oder 10 µg rOspC  
in 100 µl ABM2 Adjuvans (Sebak, Aldenbach, Deutschland) in den  
25 Schwanz geimpft und zweimal mit der gleichen Antigenpräparation in  
Abständen von 10 Tagen aufgefrischt. Das Immunserum (IS) wurde über  
einen Zeitraum von rund 2 Monaten nach der letzten Auffrischung  
gesammelt und enthielt die folgenden Konzentrationen von OspA- oder  
OspC-spezifischen Antikörpern (Ak), wie mit einem ELISA unter Verwen-  
30 dung von rLip-OspA oder rOspC als Substrat bestimmt wurde: Anti-OspA  
IS, 3,2 mg/ml bzw. Anti-OspC IS, 300 µg/ml. Normales Mausserum  
(NMS) wurde von naiven BALB/c-Mäusen gesammelt. Die Spezifitäten

- 13 -

der erzeugten Immunseren und NMS wurden durch Western Blot-Analyse verifiziert. Wie in Figur 1 gezeigt (Spur 3, 4) reagierte ein polyklonales Immunserum von entweder OspA- oder OspC-immunisierten Mäusen selektiv mit Proteinen mit 31 kDa (OspA) bzw. 24 kDa (OspC) aus einem 5 Gesamtzelllysat von ZS7 Spirocheten. Es wurde keine Reaktivität mit NMS gefunden (Figur 1, Spur 2).

d) Analyse von Serumantikörpern durch ELISA und Western Blot.  
Serumantikörper gegen *B. burgdorferi* OspA bzw. OspC wurden durch 10 einen Festphasen-ELISA, wie im Stand der Technik beschrieben (Kramer et al., Immunobiol. 181 (1990), 357-366), quantifiziert, wobei 1 µg/ml Gesamtzelllysat von *B. burgdorferi*, Stamm ZS7, rLip-OspA (ZS7) bzw. rOspC (ZS7) als Substrate verwendet wurden. Die Western Blot-Analyse wurde, wie im Stand der Technik beschrieben (M.M. Simon et al., J. Infect. Dis. 164 (1991), 123-132), unter Verwendung eines Gesamtzell- 15 lysats des *B. burgdorferi*-Stammes ZS7 als Antigenpräparation durchgeführt.

e) Passiver Transfer von Immunserum zum Schutz vor und zur Behandlung einer Infektion.  
Für passiven Schutz wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche C.B.-17 scid-Mäuse intraperitoneal (i.p.) entweder mit einem OspA- oder einem OspC- 20 reaktiven polyklonalen Immunserum 1 Stunde vor der Infektion injiziert. Kontrollmäuse erhielten 100 µl NMS. Zur Infektion wurden die Mäuse s.c. mit  $1 \times 10^3$  *B. burgdorferi* ZS7 Organismen in den Schwanz injiziert.

Alternativ wurden für die passive Behandlung einer bestehenden Infektion scid-Mäuse zunächst mit  $1 \times 10^3$  ZS7 Spirocheten (s.c.) infiziert, und es 25 wurden ihnen anschließend wiederholt (vier mal in Abständen von 3 bis 4 Tagen) verschiedene Mengen von polyklonalem Immunserum verabreicht, das entweder für OspA oder Ospc spezifisch war (i.p.), wobei am Tag 30 10, 19 oder 60 nach der Infektion (p.i.) begonnen wurde. Die Tiere wurden hinsichtlich der Entwicklung von klinischer Arthritis in den

- 14 -

tibiotarsalen Gelenken beobachtet. Die Härte der Arthritis wurde in dem rechten und linken tibiotarsalen Gelenk wie folgt beurteilt: + +, schwer; + mäßig schwer; ±, milde Schwellung; (±), Rötung; -, keine klinischen Zeichen.

5

Zu den angegebenen Zeiten wurden die Mäuse hinsichtlich der Anwesenheiten von Spirocheten durch Kultivierung von Ohrgewebeproben untersucht, wobei, wie im Stand der Technik beschrieben, vorgegangen wurde (Sinsky et al., J. Clin. Microbiol. 27 (1989), 1723-1727).

10

Für histopathologische Untersuchungen wurden die Mäuse zu den angegebenen Zeiten nach der Infektion getötet. Das tibiotarsale Gelenk, das Herz, die Leber und die dem tibiotarsalen Gelenk benachbarten Muskeln wurden in 10 %igem Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die entzündeten Läsionen wurden wie folgt beurteilt: + + +, sehr schwer; + +, schwer; +, mäßig; ±, mild; -, keine.

15

### Beispiel 2

20

Ergebnisse:

25

Drei Inzucht-Maus-Stämme, AKR/N, BALB/c und C57BL/6 mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber einer *B. burgdorferi*-induzierten Erkrankung (U.E. Schaible et al., Eur. J. Immunol. 21 (1991), 2397-2405) wurden mit  $10^3$  Spirocheten infiziert. Die Kinetik der spezifischen Antikörperantworten, der Entwicklung von Arthritis sowie der Beständigkeit von Spirocheten wurden bis zu 90 Tage nach der Infektion beobachtet. Alle mit *B. burgdorferi* geimpften Tiere waren infiziert, wie durch Serokonversion gezeigt (Figur 2A). Alle Tiere bildeten ähnliche Mengen von *B. burgdorferi*-spezifischen IgG-Antikörpern, welche zuerst am 14. Tag nach der Infektion nachweisbar waren und während dem gesamten Beobachtungszeitraum ständig anstiegen. Darüberhinaus entwickelten

30

- 15 -

alle Mäuse beträchtliche, aber variable Mengen von OspC-spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern (Figur 2A). OspC-spezifische IgM-Antikörper waren zuerst am 4. Tag nach der Infektion nachweisbar, erreichten einen Höhepunkt am 14. Tag nach der Infektion und fielen danach auf Grundlinienwerte am 24. Tag nach der Infektion ab. OspC-spezifische IgG-Antikörper wurden zunächst am 14. Tag p.i. beobachtet mit einem Höhepunkt am 23. Tag p.i. (Höchstwerte für AKR/N, C57BL/6: etwa 8 µg/ml; BALB/c: etwa 3 µg/ml). Die Antikörpertiter in AKR/N- und C57BL/6-Mäusen nahmen im Laufe der Zeit ab, aber blieben bei detektierbaren Gehalten (etwa 3 µg/ml) bis zu 90 Tagen p.i. Im Gegensatz dazu bildeten BALB/c-Mäuse geringere Mengen von OspC-spezifischen IgG-Antikörpern in der frühen Phase der Infektion, aber die Serumtitre nahmen im Verlauf der Zeit nach der Infektion zu. Wie von früheren Studien zu erwarten (Schaible et al., Immunol. Lett. 36 (1993), 219-226; L. Gern et al., J. Infect. Dis. 167 (1993), 971-975) wurden in keinem der Seren von infizierten Mäusen während des gesamten Beobachtungszeitraums von 90 Tagen Antikörper gegen OspA nachweisbar, weder durch ELISA- noch durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines spirochetalen Lysats oder rekombinantem OspA.

Eine enge Korrelation zwischen Serumtitern von Anti-OspC-Antikörpern und spontaner Auflösung der Infektion konnte gefunden werden. Wie in Figur 2B gezeigt war die Menge an OspC-spezifischen IgG-Antikörpern in den 8 Mäusen, aus denen keine Spirocheten rekultiviert werden konnten, beträchtlich höher als in solchen, von denen positive Kulturen erhalten wurden ( $10 \pm 5 \mu\text{g}/\text{ml}$  gegenüber  $4,8 \pm 2,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Auf der anderen Seite wurde keine Korrelation zwischen dem Gesamtgehalt an *B. burgdorferi*-spezifischen IgG-Antikörpern und Eliminierung von Spirocheten gefunden. Dies zeigt, dass OspC-spezifische Antikörper in der Lage sind, Spirocheten in Wirbeltieren zu inaktivieren und eine Infektion zu bekämpfen.

Beispiel 3

Es wurden Passivtransferexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob es mit polyklonalem IS, das spezifisch für rOspC ist, möglich ist, eine nachgewiesene B. burgdorferi-Infektion in scid-Mäusen zu heilen. Ein für rLip-OspA-spezifisches polyklonales Immunserum diente als Kontrolle. Es wurde herausgefunden, dass unterschiedliche Dosismengen von OspC-spezifischen Antikörpern für die Prävention bzw. Behandlung der Infektion nötig waren. Ein passiver Transfer von 3 µg OspC-spezifischen Antikörpern in scid-Mäuse 1 Stunde vor der Infektion führte zu einem vollständigen Schutz gegen die Erkrankung und Infektion in allen untersuchten Mäusen (Tabelle 1). Wie zuvor gezeigt, wurde ein vollständiger Schutz auch mit 3 µg OspA-spezifischen Antikörpern, nicht aber mit Normal-Maus-Serum unter ähnlichen Bedingungen beobachtet (Tabelle 1 und M.M. Simon et al., J. Infect. Dis. 164 (1991), 123-132). Im Gegensatz dazu verhinderte eine wiederholte Verabreichung von 3 µg/Maus OspC-spezifischen Antikörpern (4 x in Zeitabständen von 3 bis 4 Tagen), wobei am 10. Tag nach der Infektion begonnen wurde, einem Zeitpunkt, an dem sich Spirocheten verbreitet haben und die Entzündung von Gelenken und Herz anfängt, nur teilweise die Entwicklung von klinischer Arthritis. Spirocheten konnten in dieser Menge nicht inaktiviert werden.

Für die Passivtransferexperimente wurden deshalb Immunseren verwendet, die 10 µg Anti-OspC-Antikörper enthielten. Wie in Tabelle 1 gezeigt, verhinderte ein solches wiederholt verabreichtes Immunserum (10 µg, 4 x in Abständen von 3 bis 4 Tagen), wobei entweder am 10. oder 19. Tag nach der Infektion begonnen wurde, vollständig das Auftreten von und heilte aufgetretene klinische Arthritis in allen infizierten scid-Mäusen. Spirocheten konnten aus den Ohrgewebeproben nicht rekultiviert werden. Im Gegensatz dazu und wie aus früheren Untersuchungen erwartet (Schaible et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772) hatte ein wiederholter passiver Transfer von ähnlichen Mengen von anti-OspA-

- 17 -

spezifischen Antikörpern am 10. oder 19. Tag keine Wirkung auf klinische Arthritis und Infektion. Höchst bemerkenswert und überraschend ist es, dass anti-OspC-spezifische Antikörper in der Lage waren, eine chronische Erkrankung und Infektion in Mäusen aufzulösen. Dies wird 5 durch die Tatsache verdeutlicht, dass der passive Transfer des jeweiligen Immunserums, angefangen am 60. Tag p.i. zu einer beträchtlichen Verringerung von klinischer Arthritis innerhalb 10 Tagen nach der Behandlung und zu einer praktisch vollständigen Auflösung in den folgenden 30 Tagen führte (Tabelle 2). Während das Pathogen aus dem Ohrgewebe von allen infizierten scid-Mäusen vor der Behandlung (am Tag 38 p.i.) rekultiviert werden konnte, enthielt keine der Proben, die von den gleichen Tieren am 20. Tag nach dem Antikörpertransfer (Tag 80 p.i.) genommen wurden, detektierbare Mengen an Spirocheten. Kein Rückfall 10 von klinischer Arthritis wurde bis zu 40 Tage nach der Behandlung beobachtet, unabhängig davon, ob das Immunserum (10 µg/Maus anti-OspC-spezifische Antikörper) am 10., 19. oder 60. Tag p.i. transferiert 15 wurde.

#### Beispiel 4

20 Die therapeutische Wirkung eines polyklonalen Immunserums, das gegen OspC gerichtet ist, auf eine vorhandene Erkrankung und Infektion von scid-Mäusen wurde weiter durch histopathologische Untersuchungen der betroffenen Organe bestätigt. Wie in Tabelle 3 gezeigt, wurden signifikante histopathologische Veränderungen in den Gelenken, im Herz, in der Leber und im Muskel von infizierten, aber ansonsten unbehandelten scid-Mäusen oder solchen, die lediglich NMS erhielten, festgestellt. Wie bereits früher gezeigt wurde (U.E. Schaible et al., Am. J. Pathol. 137 25 (1990), 811-820) wurden chronische progressive Entzündungsveränderungen am meisten in tibiotarsalen Gelenken, im Herz und in der Leber festgestellt und bestanden während des gesamten Beobachtungszeitraums (45 Tage p.i.). Mäuse, die ein Immunserum erhalten hatten, das 30

- 18 -

entweder für OspC oder OspA (3 µg spezifische Antikörper/Maus) 1 Stunde vor der Infektion erhalten hatten, zeigten keine pathologischen Veränderungen an einem der vier Organe, wenn am 45. Tag p.i. untersucht. Darüberhinaus zeigten Mäuse, die ein gegen OspC gerichtetes 5 Immunserum (10 µg spezifische Antikörper/Maus) am 10. oder 19. Tag nach der Inokulation erhalten hatten, wenn überhaupt nur geringfügige entzündete Läsionen in Gelenken, Herz, Leber und Muskel. Im Gegensatz dazu hatte gegen OspA gerichtetes Immunserum (10 µg spezifische 10 Antikörper/Maus) keine Wirkung auf die Entwicklung oder Progression der Entzündung in den betroffenen Organen (Tag 19 p.i.).

#### Beispiel 5

Herstellung von OspC-GST Fusionsprotein und Reinigung von rek. OspC

15 Die Klonierung von OspC in den Expressionsvektor pGEX-2T wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) Amplifikation des OspC-Gens von Aminosäure 20 - 211 mittels PCR  
(Primer: ATGGATCCAATAATTCAAGGAAAAGATGGG und  
20 ATGAATTCTAAGGTTTTTGACTTTCTACC)
- 2) Klonierung des PCR-Fragments in pGEX-2T nach BamHI/EcoRI-Verdau
- 3) Transformation von E.coli DH5<sup>a</sup>
- 4) Expression rek. OspC-GST entsprechend der Vorschrift des Her-  
steller (Pharmacia Biotech)
- 5) Anreicherung von OspC-GST über Gluthatione Seph. 4B-Säulen
- 6) Spaltung von OspC-GST mittels Thrombin und Reinigung. Hierzu wurden vier OspC-GST Protein-Präparationen über Nacht mit Thrombin Protease verdaut und OspC von GST über eine Glutation 30 Seph. 4B-Säule getrennt.

**Patentansprüche**

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit,  
durch gekennzeichnet,  
dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für  
das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist.
- 10 2. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit,  
durch gekennzeichnet,  
dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für  
das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* mit der in SEQ ID  
NO. 2 dargestellten Sequenz ist.
- 15 3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2,  
durch gekennzeichnet,  
dass sie einen für OspC spezifischen polyklonalen Antikörper  
umfasst.
- 20 4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2,  
durch gekennzeichnet,  
dass sie einen oder mehrere für OspC spezifische monoklonale  
Antikörper umfasst.
- 25 5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche,  
durch gekennzeichnet,  
dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für  
rekombinantes OspC von *B. burgdorferi* des Stammes ZS7 ist.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass sie Antikörper der Klasse IgG und/oder IgM als Wirkstoff  
umfasst.

5

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

10

dass sie zur intraperitonealen Verabreichung vorgesehen ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

15

dass sie 1 µg bis 10 mg Antikörper als Wirkstoff umfasst.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

20

dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen  
pathogenen *B. burgdorferi* Organismen infiziert wurden, das Fort-  
schreiten von Arthritis und Carditis verhindert.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

25

dass sie in immundefizienten Scid-Mäusen, die mit lebensfähigen  
pathogenen *B. burgdorferi* Organismen des Stammes ZS7 infiziert  
wurden, das Fortschreiten von Arthritis und Carditis verhindert.

30

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,  
dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen pathogenen *B. burgdorferi* Organismen infiziert wurden, zur Heilung von Arthritis und Carditis führt.

5

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,  
dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen pathogenen *B. burgdorferi* Organismen infiziert wurden, zur Inaktivierung der Spirocheten führt.

10

13. Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit,

15

dadurch gekennzeichnet,  
dass er als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist.

20

14. Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit,

dadurch gekennzeichnet,  
dass er als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz ist.

25

15. Impfstoff nach Anspruch 13 oder 14,

dadurch gekennzeichnet,  
dass er einen gegen OspC spezifischen polyklonalen Antikörper umfasst.

30

16. Impfstoff nach Anspruch 13 oder 14,

dadurch gekennzeichnet,  
dass er einen oder mehrere für OspC spezifische monoklonale Antikörper umfasst.

17. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er Antikörper umfasst, die spezifisch für rekombinantes OspC  
von *B. burgdorferi* des Stammes ZS7 sind.

5

18. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er Antikörper der Klasse IgG und/oder IgM als Wirkstoff  
umfasst.

10

19. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen  
pathogenen *B. burgdorferi* Organismen infiziert wurden, die Ausbil-  
dung von Arthritis und Carditis verhindert.

15

20. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 19,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er 0,1 µg bis 1 mg Antikörper als Wirkstoff umfasst.

20

21. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er weiterhin Antikörper umfasst, die spezifisch für das 31kDa  
Antigen (OspA) von *B. burgdorferi* sind.

25

22. Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffs zur Behandlung der  
Lyme-Krankheit aus einem Versuchstier,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man das Versuchstier mit OspC-Antigen impft und ein  
Immunserum gewinnt, welches für das OspC-Antigen spezifische  
Antikörper enthält.

30

23. Verfahren nach Anspruch 22,

dadurch gekennzeichnet,

dass man das Versuchstier mit rekombinantem OspC impft.

5 24. Verfahren nach Anspruch 23,

dadurch gekennzeichnet,

dass man BALB/c-Mäuse mit rekombinantem OspC dreimal in Abständen von 10 Tagen impft und das Immunserum über einen Zeitraum von 2 Monaten nach der letzten Verabreichung des

10 Antigens gewinnt.

25. Verfahren zur Gewinnung eines Impfstoffes gegen die Lyme-Krankheit aus einem Versuchstier,

dadurch gekennzeichnet,

15 dass man das Versuchstier mit OspC impft und ein Immunserum gewinnt, das für OspC spezifische Antikörper enthält.

26. Verfahren nach Anspruch 25,

dadurch gekennzeichnet,

20 dass man das Versuchstier mit rekombinantem OspC impft.

27. Verfahren nach Anspruch 26,

dadurch gekennzeichnet,

25 dass man BALB/c-Mäuse mit rekombinantem OspC dreimal in Abständen von 10 Tagen impft und das Immunserum über einen Zeitraum von 2 Monaten nach der letzten Verabreichung des Antigens gewinnt.

28. Polyklonaler Antikörper, erhältlich nach einem der Ansprüche 22 bis 26,

dadurch gekennzeichnet,

30 dass er für OspC spezifisch ist.

29. Polyklonaler Antikörper, erhältlich nach einem der Ansprüche 22 bis 26,

dadurch gekennzeichnet,  
dass er für OspC mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz spezifisch ist.

30. Monoklonaler Antikörper gegen OspC.

31. Monoklonaler Antikörper gegen OspC der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz.

32. Antigen,

dadurch gekennzeichnet,  
dass es mit einem Antikörper gegen OspC nach einem der Ansprüche 1 bis 21 immun reagiert.

33. Antigen nach Anspruch 32,

dadurch gekennzeichnet,  
dass es die in Seq. ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein immunogenes Epitop aus dieser Sequenz umfasst.

34. Rekombinante DNA,

dadurch gekennzeichnet,  
dass sie für ein Antigen nach einem der Ansprüche 26 oder 27 codiert und (1) die in Seq. ID NO. 1 dargestellte Nukleinsäuresequenz, (2) eine hier im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Sequenz oder (3) eine mit der Sequenz aus (1) oder/und (2) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz umfasst.

30

35. Rekombinanter Vektor,

dadurch gekennzeichnet,

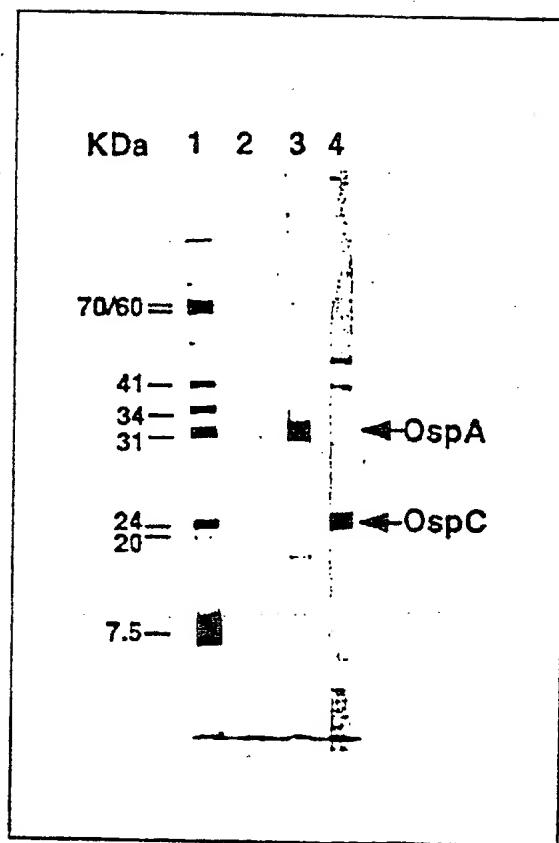
dass er eine oder mehrere Kopien einer rekombinanten DNA nach Anspruch 34 enthält.

36. Verfahren zur Gewinnung von Antigenen nach einem der Ansprüche 32 oder 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man eine B. burgdorferi Genbank mit einem oder mehreren Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 18 untersucht und die Klone isoliert, welche mit dem oder den Antikörpern eine positive Immunreaktion zeigen.
  37. Verfahren zur Gewinnung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit oder eines Impfstoffes gegen die Lyme-Krankheit,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man Versuchstiere mit einem Antigen nach einem der Ansprüche 32 oder 33 immunisiert und aus dem immunisierten Versuchstier auf übliche Weise protektive, polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen OspC gewinnt.
  38. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, zur Behandlung der Lyme-Krankheit.
  39. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, als Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit.

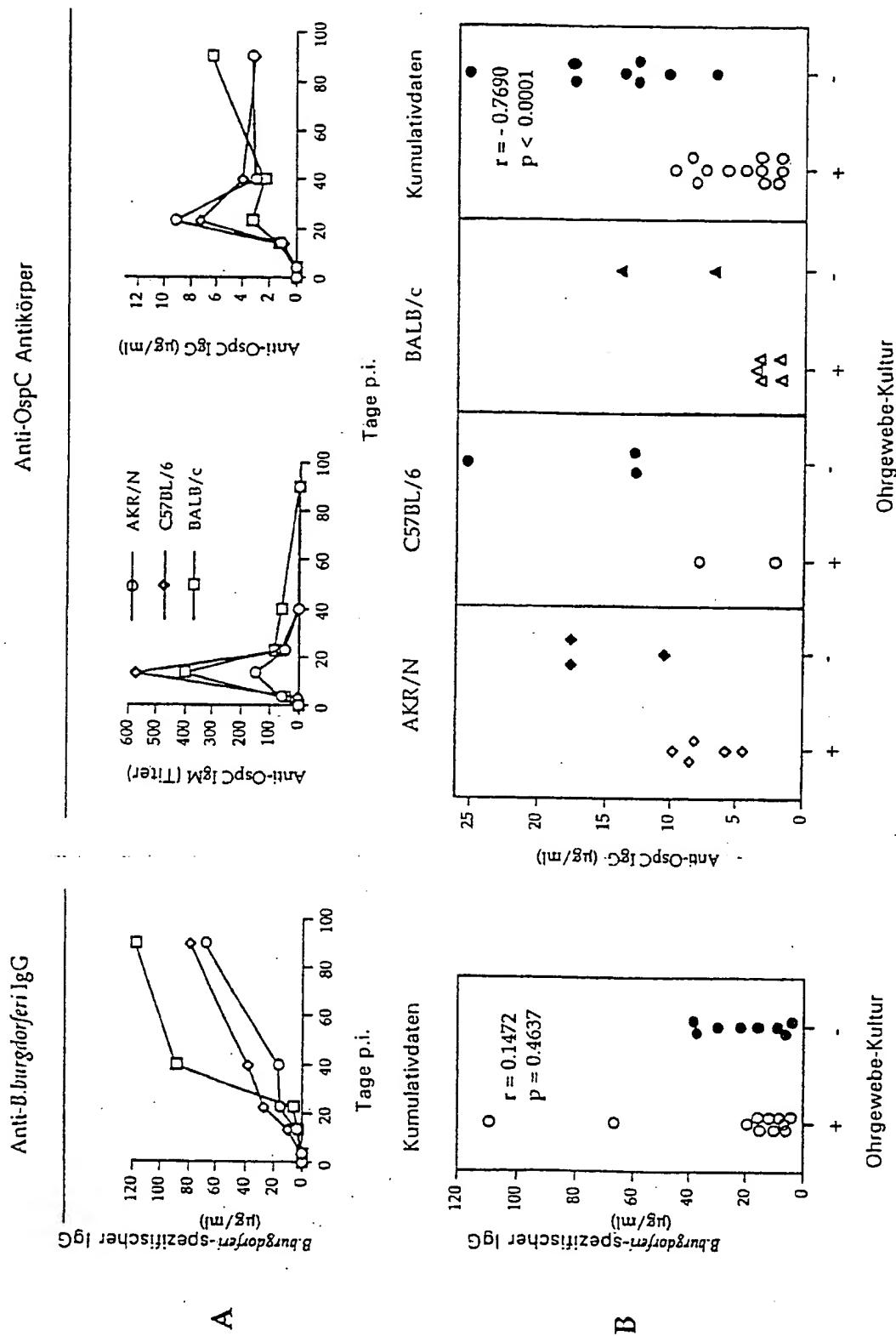
40. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 oder 39,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass der Wirkstoff ein polyklonaler Antikörper ist.
- 5 41. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 oder 39,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass der Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.
- 10 42. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als  
Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa  
Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist, zur Herstellung eines Arznei-  
mittels zur Behandlung der Lyme-Krankheit.
- 15 43. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als  
Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa  
Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist, zur Herstellung eines Arznei-  
mittels als Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit.
- 20 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass der Wirkstoff ein polyklonaler Antikörper ist.
- 25 45. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass der Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.
- 30 46. Verfahren zur Behandlung der Lyme-Krankheit,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass einem an der Lyme-Krankheit erkrankten Patienten ein phar-  
mazeutisches Präparat verabreicht wird, welches als Wirkstoff  
einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen  
(OspC) von *B. burgdorferi* ist.

47. Verfahren zur Prävention der Lyme-Krankheit,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass einem Patienten ein Impfstoff verabreicht wird, der als Wirk-  
stoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa  
Antigen (OspC) von *B. burgdorferi* ist.

Figur 1



Figur 2



3/4

Figur 3: SEQ ID NO. 2

Gen-Sequenz und Protein-Sequenz des Outer-Surface-Protein C  
 (OspC) isoliert aus dem europäischen *Borrelia burgdorferi* sensu  
 stricto Stamm ZS7

1	atgaaaaagaatacattaagtgcataattaaatgacttttatTTtatTTtatTTgtaat -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ tactttttcttatgtattcacgttataattactgaaataaaaataatagaacatta M K K N T L S A I L M T L F L F I S C N	60
61	aattcaggaaaagatggaaatgcattctgcaattctgtatgatggatctgttaaaggccct -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ttaagtcccttttctacccttacgttagacgttaagacgactactcagacaatttcccgga N S G K D G N A S A N S A D E S V K G P	120
121	aatcttacagaaaataagtaaaaaattacggattctaattgcggTTTacttgctgtgaaa -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ttagaatgtctttattcatTTTTtaatgcctaagattacgcacaaatgaacgacacttt N L T E I S K K I T D S N A V L L A V K	180
181	gagggttgaagecgTTcrgtcatctatacgatgagcttgcataagctattggtaaaaaata -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ctccaaacttcgcaacgacagtagatatactcgaacgatttcgataaccatTTTTat E V E A L L S S I D E L A K A I G K K I	240
241	aaaaacgatggtagtttagataatgaagcaaattcgcaacgagtcattgttagcaggagct -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ tttttgcattaccatcaaattttacttcgttttagcgttgcattcataacaatgccttcga K N D G S L D N E A N R N E S L L A G A	300
301	tatacaatatacaccataaacacaaaaattaagtaaaattaaacggatcagaaggTTta -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ atatgttatagtttgaaattatgtgttttaattcatTTtaattgccttagtcttccaaat Y T I S T L I T Q X L S K L N G S E G L	360
361	aaggaaaaagattggcgagctaaagaaaatgctctgaagcattactgacaaaattaaaaat -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ttccttttcttaacggcgteattttacgagacttcgttaatgactgtttaaattttta K E K I A A A K K C S E A F T D K L K N	420
421	gagcacgcaagtcttggtaaaaaagatgctactgtatgatgatgcaaaaaaagctattttta -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ctcgtgcgttcaacccatTTTtacgatgactactacgttttttcgataaaaat B H A S L G K K D A T D D D A K K A I L	480
481	aaagcaaattgcagcggtaaaagataagggcgTTgaagaacttggatca -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ttcgttttacgtcgcccattttatTCGCAACTTCTGAACCTTCAACAGGCCTAGT K A N A A G K D K G V E E L E K L S G S	540
541	ttagaaaagcttataaaaagcagctaaagagatgcttgcataattcagttaaagagcttaca -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ aatctttcgaatagtTTTGTGATTCTCTCGAACGATTAAGTCATTCTCGAATGT L E S L S K A A K E M L A N S V K E L T	600
601	agtccctgtgtggtagaaagtccaaaaaaccttaa -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ tcaggacaacacatTTTCAAGGTTTTGGAAATT S P V V V E S P K K P *	636

4/4

Figur 4

Plasmidname: pG.OspC-ZS Größe: 5,5 kb

Insert: OspC Gen Insert Größe: 0,6 kb  
 (Spezies) ohne Signalsequenz  
 (B.burgdorferi ZS7)  
 PCR-Fragment

Klonierungsvektor: pGEX-2T (Pharmacia Biotech)

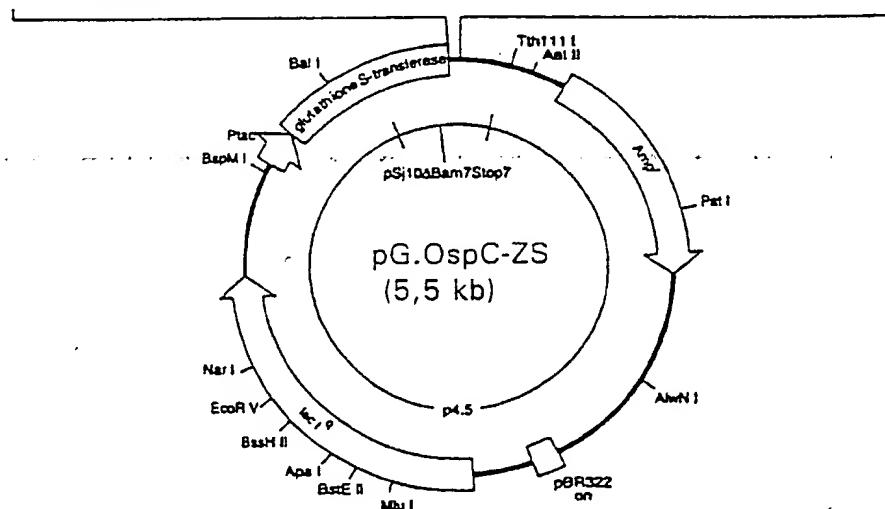
Klonierungsstelle: BamHI/EcoRI

Antibiotikaresistenz: Amp'

Eingabedatum: 1. 11. 94

Thrombin

Leu Val Pro Arg Gly Ser Asn Asn Ser Lys Lys Pro \*  
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC AAT AAT TCA - OspC - AAA AAA CCT TAG AAT TCA  
 BamHI Eco RI



## **SEQUENZPROTOKOLL**

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der  
Wissenschaften e.V.  
(B) STRASSE: Hofgartenstrasse 2  
(C) ORT: Muenchen  
(E) LAND: DE  
(F) POSTLEITZAHL: 80539

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Arzneimittel zur Therapie einer manifesten Lyme-Borreliose

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 19740735.8

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 636 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 1..636

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

ATG AAA AAG AAT ACA TTA AGT GCA ATA TTA ATG ACT TTA TTT TTA TTT
Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe
   1          5          10         15

```

48

ATA TCT TGT AAT AAT TCA GGA AAA GAT GGG AAT GCA TCT GCA AAT TCT  
 Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Ala Ser Ala Asn Ser  
                  20                 25                 30

96

GCT GAT GAG TCT GTT AAA GGG CCT AAT CTT ACA GAA ATA AGT AAA AAA  
 Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys  
 35 40 45

144

ATT ACG GAT TCT AAT GCG GTT TTA CTT GCT GTG AAA GAG GTT GAA GCG  
Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala  
50 55 60

192

TTG CTG TCA TCT ATA GAT GAG CTT GCT AAA GCT ATT GGT AAA AAA ATA  
Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile  
65 70 75 80

240

AAA AAC GAT GGT AGT TTA GAT AAT GAA GCA AAT CGC AAC GAG TCA TTG  
Lys Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu

TTA GCA GGA GCT TAT ACA ATA TCA ACC TTA ATA ACA CAA AAA TTA AGT Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser 100 105 110	336
- AAA TTA AAC GGA TCA GAA GGT TTA AAG GAA AAG ATT GCC GCA GCT AAG Lys Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys 115 120 125	384
AAA TGC TCT GAA GCA TTT ACT GAC AAA TTA AAA AAT GAG CAC GCA AGT Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr Asp Lys Leu Lys Asn Glu His Ala Ser 130 135 140	432
CTT GGT AAA AAA GAT GCT ACT GAT GAT GAT GCA AAA AAA GCT ATT TTA Leu Gly Lys Lys Asp Ala Thr Asp Asp Asp Ala Lys Lys Ala Ile Leu 145 150 155 160	480
AAA GCA AAT GCA GCG GGT AAA GAT AAG GGC GTT GAA GAA CTT GAA AAG Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys 165 170 175	528
TTG TCC GGA TCA TTA GAA AGC TTA TCA AAA GCA GCT AAA GAG ATG CTT Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu 180 185 190	576
GCT AAT TCA GTT AAA GAG CTT ACA AGT CCT GTT GTG-GTA GAA AGT CCA Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Val Glu Ser Pro 195 200 205	624
AAA AAA CCT TAA Lys Lys Pro * 210	636

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 212 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe 1 5 10 15
Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Ala Ser Ala Asn Ser 20 25 30
Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys 35 40 45
Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala 50 55 60
Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile 65 70 75 80
Lys Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu 85 90 95
Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser 100 105 110
Lys Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys 115 120 125
Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr Asp Lys Leu Lys Asn Glu His Ala Ser 130 135 140

Leu Gly Lys Lys Asp Ala Thr Asp Asp Asp Ala Lys Lys Ala Ile Leu  
145 150 155 160

Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys  
165 170 175

Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu  
180 185 190

Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Val Glu Ser Pro  
195 200 205

Lys Lys Pro \*  
210

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGGATCCAA TAATTCAAGGA AAAGATGGG

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGAATTCTT AAGGTTTTTT TGGACTTTCT ACC

33